

High performance capillary gel electrophoresis.

Publication number: JP5249080 (A)

Publication date: 1993-09-28

Inventor(s): BARI ERU KAAGAA; ROJIYAA DABURIYU GIISU; EBA SUZOKO +

Applicant(s): UNIV NORTHEASTERN +

Classification:

- **international:** G01N27/447; G01N27/447; (IPC1-7): G01N27/447

- **European:** G01N27/447B6

Application number: JP19920041983 19920131

Priority number(s): US19910649673 19910201

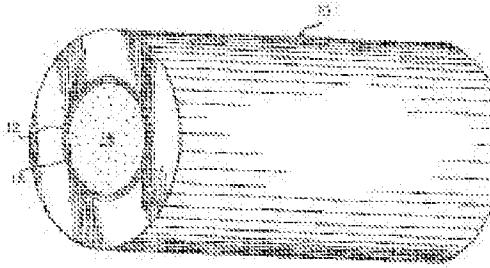
Also published as:

EP0500204 (A1)

CA2060367 (A1)

Abstract of JP 5249080 (A)

PURPOSE: To reduce the penetration of electricity thereby to stabilize a column and manipulate the capillary column in a high electric field by providing a coating matrix of high stability which has a hydrophobic intermediate layer on an inner surface of a capillary wall. **CONSTITUTION:** A capillary column includes a capillary 10 which is coated with a stable coating matrix 12 at an inner wall face 14 thereof. The coating matrix 12 has a hydrophilic outer layer. The capillary 10 has a polymer gel-filler 16 at a hole thereof. The considerably stable coating matrix 12 between the polymer gel 16 and inner face 14 of the capillary column includes a hydrophobic- phase intermediate layer chemically bonded to the inner wall of the capillary column, a cleaning agent physically absorbed to the hydrophobic phase and molecules covalent bonded to the cleaning agent absorbed through molecular polymerization and forming the hydrophilic outer layer of the coating matrix 12.



.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平5-249080

(43)公開日 平成5年(1993)9月28日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 27/447

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7235-2 J

G 0 1 N 27/ 26

3 1 5 Z

審査請求 未請求 請求項の数18(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平4-41983

(22)出願日 平成4年(1992)1月31日

(31)優先権主張番号 07/649, 673

(32)優先日 1991年2月1日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591127113

ノースイースタン・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ
州、ボストン、ハンティントン・アベニュー
ー 360

(72)発明者 パリー・エル・カーガー

アメリカ合衆国 02159 マサチューセッツ
州、ニュートン、デボラ・ロード 62

(72)発明者 ロジャー・ダブリュ・ギース

アメリカ合衆国 02170 マサチューセッツ
州、クインシー、オークランド・アベニュー
ー 56

(74)代理人 弁理士 秋元 輝雄

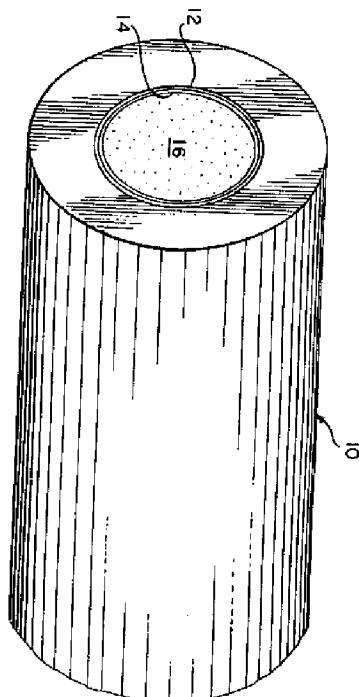
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高速キャピラリーゲル電気泳動方法、およびそのカラムとその調整方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 高い安定性を有しさに数回使用してもその機能が低下せず、また高電界中でも操作可能である、高分解能を有する電気泳動用キャピラリーカラムを提供する。

【構成】 キャピラリーウィールの内部表面に共有的に結合する被覆物質の薄層と被覆物質の層上に吸収される親水性ポリマーの薄層を含む高速ゲル電気泳動用キャピラリーカラム。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 改良された高速キャビラリー電気泳動用高安定性キャビラリーカラムであって、内部キャビティと内部表面の壁を有するキャビラリー、外壁面の該内部表面上の高安定性被覆マトリクスであって、外壁面の該内部表面に共有結合している中間層の疎水相を含むマトリクス、該疎水相に物理的に吸収される洗浄剤、および該被覆マトリクスの親水性外層を形成する該洗浄剤にそれによつて共有的に付着する重合されたモノマーを含有するキャビラリーカラム。

【請求項2】 更に該内部キャビティ内に充填されたポリマーゲルを含んでなることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項3】 該キャビラリーが石英ガラスで作られていることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項4】 該疎水相がアルキルシラン部分を含んでなることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項5】 該疎水相がC₁₈-シラン部分を含んでなることを特徴とする請求項4に記載のキャビラリーカラム。

【請求項6】 該洗浄剤が、ステロイド系、ポリオキシエチレン系、ポリヒドロキシ系、アミン系、カルボン酸系洗浄剤から選ばれることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項7】 該洗浄剤がドデシルマルトシドであることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項8】 該モノマーが、ビニルモノマー、アクリルモノマー、アクリルアミド、およびN, N, N, -トリス(ヒドロキシメチル)アクリルアミドから選ばれるオレフィン性モノマーであることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項9】 該重合されたモノマーがさらに少なくとも1種類の架橋剤を含有することを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項10】 該ポリマーゲルが重合された非架橋モノマーを含んでなることを特徴とする請求項2に記載のキャビラリーカラム。

【請求項11】 該ポリマーゲルが少なくとも1種類の重合されたモノマーと少なくとも1種類の架橋剤を含んでなることを特徴とする請求項2に記載のキャビラリーカラム。

【請求項12】 改良された高速キャビラリー電気泳動用高安定性キャビラリーカラムを調整する方法であつて、以下の工程を含むことを特徴とする調整方法。内部キャビティと内部表面を有する壁面を有する石英ガラスキャビラリーカラムを提供し、疎水相を該壁面の該内部表面に化学的に結合させ、

該疎水相上に洗浄剤を物理的に吸収させ、ラジカル重合反応が起きるようにモノマーに該洗浄剤を露呈し、該モノマーと該吸収洗浄剤の間に共有結合が生じるよう該モノマーを重合すること。

【請求項13】 更に該内部キャビティにポリマーゲルを充填する工程を含んでなる請求項12に記載の調整方法。

【請求項14】 高速キャビラリー電気泳動を作動させる方法であつて、内部キャビティと内部表面の壁を有するキャビラリー、外壁面の該内部表面上の被覆マトリクスであつて、外壁面の該内部表面に共有結合している疎水相を含むマトリクス、該疎水相に物理的に吸収される洗浄剤、および該洗浄剤に共有的に付着する重合されたモノマーを含有するキャビラリーカラムに分割すべき被分析物質を含む試料のアリコートを射出し、少なくとも100ボルト/cmの電界を適用し、そして機器的に順に分割された被分析物質を検知、測定する、事を特徴とする電気泳動分析方法。

【請求項15】 該キャビラリーカラムが更に該内部キャビティを充填するポリマーゲルを含んでなることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 高速、高精度キャビラリー電気泳動用の石英ガラスキャビラリーの内部表面用の改良された被覆マトリクスであつて、該石英ガラスキャビラリーの該内部表面に共有結合している疎水相、該疎水相に物理的に吸収される洗浄剤、および該洗浄剤に共有的に付着する重合されたオレフィン性モノマーを含有する被覆マトリクス。

【請求項17】 該モノマーが、アクリル酸、トリメチルアミノエチルアクリルアミド、ジエチルアミノエチルアクリルアミド、ジメチルアミノエチルアクリルアミド、および2-スルホニル-1, 1-ジメチルエチルアクリルアミドから選ばれることを特徴とする請求項1に記載のキャビラリーカラム。

【請求項18】 該ポリヒドロキシ系洗浄剤が、アルキルマルトシド系、グルカミド系、ポリヒドロキシステロイド系洗浄剤から選ばれてなることを特徴とする請求項6に記載のキャビラリーカラム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は電器泳動に関し、更に詳しくは高速分析電気泳動用の改良されたキャビラリーカラムに関する。

【0002】

【従来の技術】高速キャビラリーゲル電気泳動は、米国特許第4, 865, 706号、同第4, 865, 707号、米国特許出願第07/406, 080号に記載され

ているように、オリゴヌクレオチド、中から高分子量のポリペプチド、蛋白質等の分離の技術として知られている。この技術は実質的に平板あるいはスラブ上にこれらを導くように電気泳動分割の伝統的な方法を凌ぐものである。

【0003】キャビラリー中の電気泳動に関する重要な研究は電気浸透流れの除去である。キャビラリーは、いくつかの電気泳動分割の分解能を低下させる電気浸透液体流れの効果に対し特にセンシティブである。

【0004】従来この分野の研究者は、これらの表面と連動する特異的な電荷を除去するための様々な物質で電気泳動管の内部表面を被覆することによって、電気浸透流れや他の電気泳動現象と関係する表面と(ゼータ)電位を制御することを試みた。例えば、米国特許第3,728,145号にはヒジャーテンが、開いた管内の自由電気泳動領域に於ける電気浸透を減少させるためにメチルセルロースやポリアクリラミドのような中性の親水性物質で大きな径の管の内壁を被覆するための方法が開示されている。その後の特許、同第4,860,201号には、ヒジャーテンは2官能性試薬によってキャビラリー壁に結合したポリアクリラミドの単分子被膜で狭い径のキャビラリーの内壁を被覆する方法を開示している。前記特許の背景の中、吸収および電気浸透を減少するためにポリマー物質で電気泳動の管の内壁を被覆することは、使用している間に流出するので被覆物質がしばしば更新されなければならないことおよび、完全な被覆に対し必要な比較的厚い層が電気泳動において領域変形を起こしてしまうという欠点に苦しんでいることが挙げられる。この特許はそれゆえ吸収される層として適用されるポリマー物質でキャビラリーの壁面を被覆する事からは離れていることを教示し、そのかわりに電気浸透の抑制の為にポリアクリラミドの単分子層が壁面に共有的に付着するべきであることを開示している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等以外の研究者によるキャビラリー中のゲル電気泳動の分野での研究量が低いのは、安定性が悪く高効率で高分解能を成し遂げるに充分な高電界に従うことが出来ないカラムにおける一般的な結果である。

【0006】本発明者等は米国特許出願第07/406,080号に於いてゲル充填キャビラリーにおける電気浸透流れの問題を解決するための改良された被覆に関する必要性に着目した。この出願では、キャビラリー壁の内部表面に共有的に結合する被覆物質の薄層と被覆物質の層上に吸収される親水性ポリマーの薄層を含む高速ゲル電気泳動用キャビラリーカラムを開示している。親水性ポリマーの層は高い安定性を有し、効果的に電気浸透を減少させ、カラムを安定化させ、また予期せぬ高電界中(あるいは更に的確には高出力)でのキャビラリーカラムの操作が可能になり、その結果として高分解能を

有するものである。

【0007】本発明者等は、キャビラリー中の電気浸透の効果が更に制御され、そしてもしキャビラリーカラムそれ自身が高い安定性を有し数回使用可能であれば、キャビラリーカラム中の高速電気泳動はさらに有効性を増すことを見出した。

【0008】前述の様な基準は、電気浸透の効果がほとんど無視できるまでになり、また高電界中で再使用でき洗浄できるような高安定性を有するキャビラリーカラムを要求するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】電気泳動の間、電気浸透の効果が制御し得る、例えば極めて減少された、改良され高安定性のキャビラリー電気泳動カラムに対する前述の様な要求は本発明によって答えられた。それは高速電気泳動の為の改良されたキャビラリーを提供するものである。それはキャビラリー壁の内部表面上に高い安定性の被覆マトリクスを有するキャビラリーを含んでいる。高い安定性の被覆マトリクスは、キャビラリーの内壁に化学的に結合している疎水性中間層と、該疎水層に物理的に吸収される洗浄剤、および被覆マトリクスの親水性外層を形成する吸収された洗浄剤にそれによる重合の結果として共有的に結合するようになるモノマーを含んでなるものである。

【0010】被覆マトリクスの疎水相は一般的に、例えばシラノール基の様なキャビラリー壁の内部表面上に反応するような反応性官能基を有する試薬を使用し作られている。試薬の残基は親水部分で、例えば直鎖、分岐、芳香族、環式あるいは置換の、またこれらの組合せを含む炭化水素の様なものである。

【0011】疎水性中間層に吸収される洗浄剤はイオン性、双性イオン性あるいはノニオン性で、モノマーの重合上に被覆する洗浄剤と接触するために用いられるモノマーと共有結合を形成する事が出来る親水性頭部を含有している。

【0012】上記のマトリクスは予期せぬ事に極めて安定な極性被覆マトリクスで、容易には分解せずまた従来キャビラリー被覆の主たる問題点であった使用時の流れ出しが無い、そのキャビラリーの内部壁面上に親水性外層を有するものである。更に、本被覆マトリクスは電気浸透や他の電気泳動現象と関係する表面と(ゼータ)電位を減少し、そして高電界中(あるいは正確には高出力密度中)でのキャビラリーカラムの操作を可能にし、その結果高分解能を有するものである。更にキャビラリーカラムの再利用の為にポリマーゲルの再充填を行うのと同様に複数回の洗浄後も本被覆マトリクスは安定にまた完全なままに残っている。

【0013】本発明の改良されたキャビラリーは以下の様に調整される:最初にキャビラリーの内部表面を活性化するために塩基性および酸性の物質にどちらかあるいは

は両方に接触させ、それからキャビラリー壁に化学的に結合し疎水相を形成することが出来る適當な疎水性試薬の溶液で処理する。それから洗浄剤が疎水相上に吸収される。次に洗浄剤で被覆されたキャビラリー壁がラジカル重合反応をするモノマーに露呈される。そのモノマーは任意に架橋剤を含んでもよい。開始剤および触媒がモノマーと架橋剤のラジカル重合を引き起こし、モノマーと吸収された洗浄剤の間の共有結合を生じるように加えられる。キャビラリーの壁面での重合が完了した後、吸収された洗浄剤と結合しなかった残りの重合物質が吹込あるいは吸出しでキャビラリーから取除かれる。キャビラリーの口径はそれから少なくとも1種類のモノマーおよび任意に少なくとも1種類の架橋剤、更に少なくとも1種類の遊離ラジカル源と適切な触媒で満たされてもよく、この混合物は管内で重合され、最終的にキャビラリー管内を満たすポリマー性マトリクスを形成する。

【0014】本発明のキャビラリーは特異的に安定であり、また典型的な300ボルト/cmあるいはそれ以上、また典型的な約30マクロアンペアあるいはそれ以上の電界の下でも充分機能するものである。これらの条件下では、非常に少量の物質に於いても極めて高い分解能がえられる。さらに本発明のキャビラリーはDNAのフラグメントの混合物を、その分子量のL_ogの1次関数として分析することを示した。それゆえ、未知バイオポリマーがナノグラムあるいはそれ以下でも簡便で正確な分子量分析を行うことが出来る。

【0015】本発明の被覆マトリクスはまた高速液体クロマトグラフィ(HPLC)に使用されるアルキルが結合された極性シリカ粒子の内部あるいは外部表面上に高い安定性の親水性被覆マトリクスを形成するのにも使用することが出来る。それはまたポリスチレンあるいは他の有機高分子を含む極性、疎水性HPLC粒子上にも使用することが出来る。

【0016】(発明の詳細な説明)図1に示すように、この発明のキャビラリーカラムは、キャビラリー10を含み、このキャビラリーは、その壁の内壁面14に非常に安定した被覆マトリクス12が施されていて、このマトリクスは、親水性の外層を含む。この発明のキャビラリーは、また、キャビラリー10の孔に位置するポリマーゲル充填物16を含む。

【0017】この明細書の説明において、ポリマーゲルの用語は、例えば、共有結合クロスリンク・ユニット、ファンデルワールス引力、水素結合、分子鎖の絡み合いなどの各種の手段によりともに保持され、液相中に分散されているポリマー鎖の三次元ネットワークを意味する。ポリマーのネットワークは、剛性度に充分な構造を与え、該システムの他のコンポーネンツは、ポリマー鎖の間のスペースを占有する。

【0018】キャビラリーは、電気泳動において使用される検知システムが使用される特定のマテリアルと共に

適当に作用することができれば、色々なマテリアルで作られることができる。好ましくは、キャビラリーは、石英ガラスから作られるもので、以下、説明の便宜上、石英ガラスのキャビラリーカラムの改良したものの例により説明する。

【0019】キャビラリーカラムの寸法は、電界の点で重要であり、これは、キャビラリーカラムの内径が細くなるにつれ、電流と加えられた電界による熱が低下するからである。したがって、最高の分解能分離のために、キャビラリーカラムは、最低の内径をもつことが好ましい。しかしながら、この発明の改良されたキャビラリーカラムによれば、この要素は、従来よりも重要度が低下するものである。したがって、この発明においては、内径が10マイクロメータから2000マイクロメータの範囲のキャビラリーカラムが使用される。内径の好ましい範囲は、10マイクロメータから200マイクロメータである。キャビラリーカラムの外面に施されたポリイミドコーティングによって、薄い壁のキャビラリーカラムでも取り扱いが容易となる利点がある。ポリマーゲル16とキャビラリーカラムの内面14との間に非常に安定した被覆マトリクス12は、キャビラリーカラムの内壁に化学的に結合した疎水性相の中間層、物理的に疎水性相に吸収される洗浄剤および分子の重合により吸収された洗浄剤に共有結合され、被覆マトリクスの親水性外層を形成する分子を含む。

【0020】中間層の疎水性相は、例えば、シラノールのグループのような、キャビラリーカラムの内面に、反応作用をもって反応することができる一つまたは複数の反応機能群を保有する試薬を用いて作られるのが一般的である。試薬の残りは、直鎖の、枝分かれした、芳香族の、環式の、または、置換された炭化水素で、疎水部分を含むもののような疎水部分である。石英ガラスのキャビラリーカラムに使用される好ましい中間層疎水相は、キャビラリーカラムの溶融されたシリカの壁に化学的に結合することができる疎水性反応性シランを用いて作られる。疎水相をキャビラリーカラムの壁に化学的に結合させるのに適した反応性シランは、例えば、アルキルトリアルコキシシラン、アルキルトリクロロシランおよびアルキルジ-またはトリ-エトキシまたはメトキシシランなどである。好ましい炭化水素部分は、n-オクタデシル(C₁₈)であるが、C₇-C₃₀炭素の他の炭化水素鎖も同様に適している。

【0021】疎水相に物理的に吸収される洗浄剤は、イオン性のもの、双性イオン性のもの、または、ノニオン性のものである。ノニオン性の洗浄剤は、低い電気浸透流れに好ましい。適當な洗浄剤は、次のような構造式を有する:



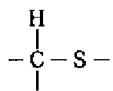
または



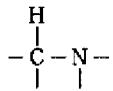
ここで、 x は、8及び40の間の数であり、Pは、化1、化2、化3、化4のグループの一つ、または、複数のものを保有する親水性部分である：

【0022】

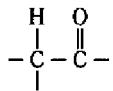
【化1】



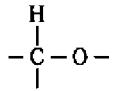
【化2】



【化3】



【化4】



【0023】Pは、低い電気浸透流れには、炭水化物グループのような三つ、または、それ以上の水酸基グループを保有する親水性部分である。

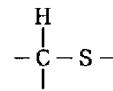
【0024】好ましい洗浄剤は、n-ドデシル-B-D-マルトシドのようなアルキルマルトシドである。他の可能なイオン性の、双性イオン性のおよびノニオン性洗浄剤は、限定するものではないが、アルキルポリエチレン洗浄剤（例えば、Brij、Triton XおよびTweens洗浄剤）、n-ドデシルアミン、アルキルカルボキシレート、リゾレシチン、およびステロイド洗浄剤（例えば、胆汁酸ナトリウム塩およびBigr-CHA P）を含む。洗浄剤の吸収についての詳細は、例えばJ. M. Neugebauer著の”Detergents”：オーバービュー”Meth. in Enzymol.” 182, 1990, 239-253頁などを参照されたい。吸収された洗浄剤は曝され、そして、洗浄剤がモノマーの重合において、引き続き共有的に付着されるモノマーの適当な選択は、ビニルモノマー、アクリルモノマー、アクリルアミド、アクリル酸、メチルアクリルアミド、およびN, N, N'-トリス（ハイドロキシメチル）アクリルアミドのようなオレフィン系モノマーを含む。他のモノマーは、限定的でないが、トリメチルアミノエチルアクリルアミド、ジエチルアミノエチルアクリルアミド、ジメチルアミノエチルアクリルアミドおよび2-スルフォニル、1, 1-ジメチルエチルアクリルアミドを含む。場合により、モノマーは、また、N, N'-メチレンビスアクリルアミドのような架橋剤を含む。

【0025】重合されたモノマーの洗浄剤への共有的付着の化学理論の詳細は、既知のものである。例えば、化5、化6、化7、化8のような部分は、ラジカル開始

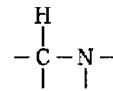
剤と反応して対応するフリーラジカル、化9、化10、化11、化12のようなラジカルをそれぞれを形成し、それと逆にオレフィン系モノマー、特にアクリル酸のようなビニルモノマーの重合反応を開始する（E. S. Huyser著、ニューヨーク Wiley-Interscience 1970発行”Free Radical Chain Reactions” 154-156頁）。このタイプの反応は、例えば、アクリルアミド、アクリロニトリルおよびメチルアクリレートのようなビニルモノマーをポリビニルアルコール、デキストラン、 starch およびカラゲーナンのような水酸基ポリマーへグラフトさせるために用いられている（G. MinioとS. Kaizerman共著、J. Polymer Sci. XXXI, 1958, 242-243頁参照）。N-置換アクリルアミド $\text{CH}_2=\text{CHCONHR}$ 、ここで、R= $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ （トリメチルアミノエチルアクリルアミド）、R= $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ （ジメチルアミノエチルアクリルアミド）、R= $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ （ジメチルアミノエチルアクリルアミド）およびR= $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ （2-スルフォニル、1, 1-ジメチルエチルアクリルアミド）、およびアクリル酸もまた、同様に、ボーラスなジオールシリカとフラクトゲルTSKクロマトグラフパッキングにグラフトされる（イー・マルク社 1989年10月カタログ；W. Muller, Eur. J. Biochem. 155, 1986, 213-222頁参照）。

【0026】

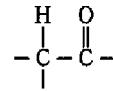
【化5】



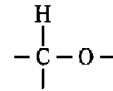
【化6】



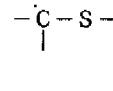
【化7】



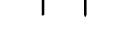
【化8】



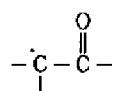
【化9】



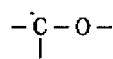
【化10】



【化11】



【化12】



【0027】ポリマーゲル充填物16を使用する場合、使用されるポリマーゲルの物質は、変化できるポア構造をもつどのようなポリマーでもよい。架橋され、または、架橋されなくともよい。適当なポリマーのシステムの例は、ポリアクリルアミド、アガロース)、およびアガロースとポリアクリルアミドの混合体である。適当な架橋剤は、N, N' -メチレンビスアクリルアミド、N, N' -ジアリルタルタルジアミドおよびN, N' -シスタミンービスアクリルアミドである。他のモノマーおよび架橋剤も当業者にとり自明である。

【0028】重合反応は、過硫酸アンモニウムおよびN, N, N', N' -テトラメチレンエチレンジアミン(TEMED)で開始されるのが好ましいが、当業者に知られているように、他のフリーラジカル重合開始剤も使用できる。

【0029】この発明の改良されたキャビラリーカラムは、次のようにして得られる。

【0030】まず最初に、キャビラリーカラムの内面を非常に安定した被覆マトリクスでコートする。このコーティングは、まず最初に、キャビラリーカラムの内面を活性化するために、1M KOH溶液のような酸性及び/または塩基性溶液に1時間にわたり室温で接触させ、ついで1M HCl溶液のような酸性及び/または塩基性溶液に1時間にわたり室温で接触させる。ついで、キャビラリーカラムを、内面が中性になるまで蒸留水で洗浄し、少なくとも10時間からオーバーナイトにわたり温度95°Cから125°Cで乾燥させる。前記の溶液のすべては、N₂のような不活性ガスを用いて、キャビラリーカラムから除かれる。

【0031】キャビラリーカラムを活性化するのに用いられる時間と温度とは、キャビラリーカラムと疎水相とが良好に結合することができるよう、キャビラリーカラムを活性化できるに充分な程度のものが選択される。

【0032】活性化されたキャビラリーカラムは、ついで、適当な溶剤中の疎水性シランのような被覆マトリクスの中間層疎水相を含む溶液約300カラム容積で洗い流される。溶剤中の適当な疎水性シランは、限定されるものではないが、0.04%のトリエチルアミンを含むトルエン中の1%オクタデシルトリエトキシシランである。ついで、キャビラリーカラムは、トルエンで洗浄され、N₂のような不活性ガスで吹き落とされ、清浄化される。ついで、キャビラリーカラムは、少なくとも2時間にわたって、約100°Cの温度まで加熱される。最後

に、キャビラリーカラムは、トルエンのような溶剤で洗われ、N₂のような不活性ガスで吹き落とされ、清浄化される。

【0033】キャビラリーカラムの内面における活性化されたグループが反応されたことを確実にするために、キャビラリーカラムをトルエン中のトリメチルクロロシランのようなエンドキャッピング試薬の溶液で10分間フラッシングされる。エンドキャッピング試薬は、石英ガラスのキャビラリーカラムの該壁における露出された未反応のシラノールグループに反応し、中性化する。ついで、キャビラリーカラムは、オープン内で少なくとも30分間にわたり温度100°Cで加熱され、ついで、トルエンおよび/またはメタノールおよび/または水で洗われる。

【0034】つぎに、洗浄剤が前記疎水性相に吸着される。10%ドデシルマルトシド水溶液のような洗浄剤を含む溶液が約1時間にわたりキャビラリーカラムに流される(300カラム容積)。ついで、N₂のような不活性ガスで吹き落とされ、清浄化される。

【0035】このようにして洗浄剤がコートされたキャビラリーカラムの内壁は、3%アクリルアミドのようなモノマーを含み、さらに、また、過硫酸アンモニウムとTEMEDのような重合触媒を含む溶液でフラッシングされる。N, N' -ビス(メチレンアクリルアミド)のような架橋試薬も濃度0.3%の状態で存在する。架橋試薬によって該モノマーは、少なくとも1時間にわたり重合され、吸着された洗浄剤に結合しない残りの重合された物質は、N₂でキャビラリーカラムから吹き落とされる。キャビラリーカラムは、水1000カラム容積で洗われる。ついで重合反応が繰り返され、吸着した洗浄剤に結合していない残りの重合したモノマーは、再度押し出され、そして、キャビラリーカラムは、前記のように、水洗いされる。

【0036】キャビラリーカラムの内面に被覆マトリクスが施された後、キャビラリーカラムにポリマーゲル充填物を充填させてもよい。キャビラリーカラム内に架橋された、または、架橋されないポリマーゲル充填物を充填させる技術は、米国特許出願第07/406,080号に詳述されている。

【0037】充填後、この発明のリヤビラリーカラムは、分析物の電気泳動分離が必要な実験での反復使用に供される。電気泳動に、この発明のキャビラリーカラムを使用する装置と技術は、さきの米国特許出願第07/406,080号に詳述されている。

【0038】改良されたコーティングマトリックスを含む、この発明の改良されたキャビラリーカラムは、極めて柔軟性に富み、各種の電気泳動条件における電気浸透および他の表面(ゼータ)電位電気泳動関連現象の影響をなくす。被覆マトリクスの極めて高度の安定性により、キャビラリーカラムは、該カラムからポリマーゲル

充填物を押し出す反復使用に充分に耐え、また、前記コーティングを施し直す必要も無しに、数限りなく使用することができる。さらに、前記コーティングは、高温度で弱いバッファーのような比較的過酷な電気泳動条件でもキャビラリーカラムを安定させる。最も重要な点は、この発明のキャビラリーカラムが電界（高いパワー）での動作で、従来大きな問題となっていたキャビラリーカラムの被覆の破壊と電気浸透の効果における変化なしに、動作できる点である。したがって、この発明のキャビラリーカラムは、極めて短時間で高度の分析分離を行うことができる。

【0039】この発明のコーティングマトリックスは、また、高能力液体クロマトグラフィ（HPLC）に使用されるアルキル結合の極性シリカ粒子の内外面に極めて安定した、親水性の被覆マトリックスを形成するのにも用いることができる。さらにまた、前記マトリックスは、ポリスチレンを含む極性HPLCに対しても使用することができる。

【0040】次に記載する実験の説明において、この発明の実験結果を述べるが、これは、この発明を限定するものではない。

【0041】

【実施例】

実験の説明

他のキャビラリーカラムと比較した、この発明のキャビラリーカラムにおける電気浸透流れの作用、効果について

pH 7.0で測定された電気浸透流れ ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{S}^{-1}$)

試験された	pH 7バッファー	メタノール	50°Cで0.2Mの NaCl含有の pH 7
被覆されていない 石英ガラス	3.2×10^{-1}	—	—
アルキルシラン/ ドデシルマルトシド			
被覆 アルキルシラン/ ドデシルマルトシド/ アクリルアミド被覆	0.56×10^{-4}	—	—
	測定不能	測定不能	測定不能

使用した方法：X. Huang, M. F. Gordon および R. N. Zare: Anal. Chem. 60 1837-1838 (1988)

【0044】このデータで、本発明のカラムにおける電気浸透流れが無視できる程度であることが示された。さらに、バッファーとしてメタノールあるいは50°Cで0.2M NaClを含む物を使用した時でさえ電気浸透流れがほとんど無いことが示されている。それゆえ、本発明のキャビラリーカラムは通常の条件下での電気浸

透

【0042】前記したように、この発明のキャビラリーカラムの高い安定性の被覆マトリクスは、優れた被覆を有していない他のキャビラリーカラムに比較し、電気浸透の効果を顕著に低下させることができる。カラムにおける電気浸透流れ ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{S}^{-1}$) を測定するテストは、X. Huang, M. F. Gordon および R. N. Zare により Anal. Chem. 60 1837-1838 (1988) に詳細に記載されている。このテストにおいては、複数のキャビラリーカラムの個々が電気泳動装置に配置され、該カラムのそれぞれの端部が"ランニング"バッファーの溶液に浸漬される。電場が該カラムに加えられ、電流が測定される。電気浸透フローは、バッファー溶液 (pH7) の濃度の変化についての電流の変化の直線ファンクションとして測定できる。この実験においては、カラムの壁面に共有的に順に付着するアルキルシランに物理的に吸着されることになる洗浄剤であるドデシルマルトシド、に共有的に付着するポリアクリルアミドのコーティングを有する本発明のキャビラリーカラムは、被覆されていない石英ガラスのキャビラリーカラムおよび、キャビラリーカラムに共有的に付着されるアルキルシラン上に吸着されるドデシルマルトシドの洗浄剤被覆を有する石英ガラスキャビラリーカラムと比較される。結果は下記の表に記載する。

【0043】

【0046】本発明のカラムの試験

透の効果が無いばかりか、50°Cもの高い温度においても電気浸透の効果が無く、高い安定性を示すことがわかる。

【0045】それと比較して、被覆されていない石英ガラスや、疎水性物質および吸着された洗浄剤で被覆されているがアクリルアミド等との共有的な付着が無いカラムでは本発明のカラムとは異なり電気浸透流れが顕著に測定されている。

石英ガラスキャビラリーが高安定性の被覆マトリクスで被覆されたことを上述した。被覆は、石英ガラス壁面に共有的に付着するC₁₈—アルキルシランの疎水相を含み、洗浄剤であるドデシルマルトシドが物理的に疎水相に吸着し、そして重合されたアクリルアミドモノマーが共有的に洗浄剤被覆に付着した。カラムはモノマー3%、架橋剤0%含有のポリマーゲル充填剤で充填された。

【0047】OX174 RF DNA-Hae III digestの試料が従来法で電気泳動用に調整され、試料のアリコートが15秒間100ボルト/cmの電界が適用されているカラムに射出された。電気泳動は25°Cで、pH8.3の0.1MのTBEバッファー中、20cm長で、10mAの電流、200V/cmで為された。得られた結果を図2に示す。

【0048】流出が完了した後、ポリマーゲル充填剤がカラムから取り出され、モノマー3%、架橋剤0%を含む新しいポリマー充填剤が被覆マトリクスの更新は無しで置換された。

【0049】電気泳動は、pBr322 DNA-Hae III digestの試料を用い、先程より25°Cそして100V/cm高い、50°C、300V/cmで為された。結果は図3に示す。

【0050】図2および3に示されたデータによれば、本発明のキャビラリーカラムが、高安定性の被覆マトリクスによる電気浸透の抑制による極めて高い分解能を有することが示されている。さらにカラムは、非架橋性ゲルの再充填でもそれに続くDNA試料の分解能に影響を及ぼすこと無く充分に安定であることが、図3で明確に示されている。

【0051】本発明の他の実施態様はここに記載されている本願の研究から当業者にとって明確なものである。また本明細書および実施例はあくまでも例であり、本発明の請求項に記載の発明はその記載に限定されないものである。

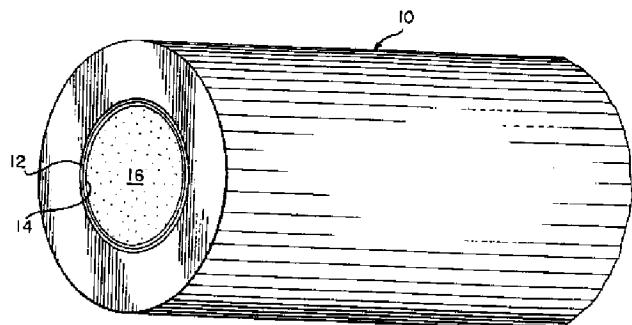
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明のゲルを含むキャビラリーの端部の断面図を含む拡大図である。

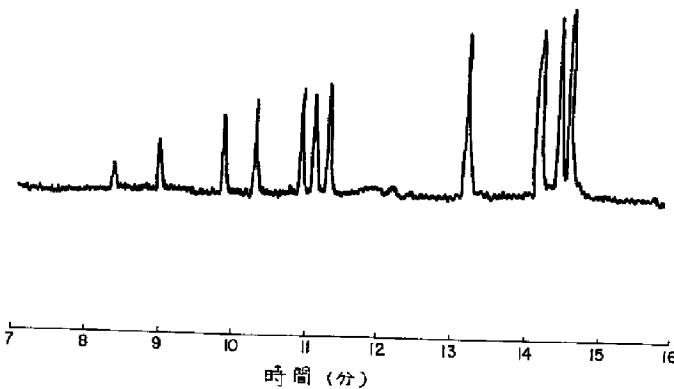
【図2】図2は、モノマー3%、架橋剤0%のポリマーゲル充填剤を含む本発明のキャビラリーカラムによる、OX174 RF DNA-Hae III digestの電気泳動分割を示す電気泳動チャートである。

【図3】図3は、本発明のキャビラリーカラムによるpBr322 DNA-Hae III digestの電気泳動分割を示す電気泳動チャートである。

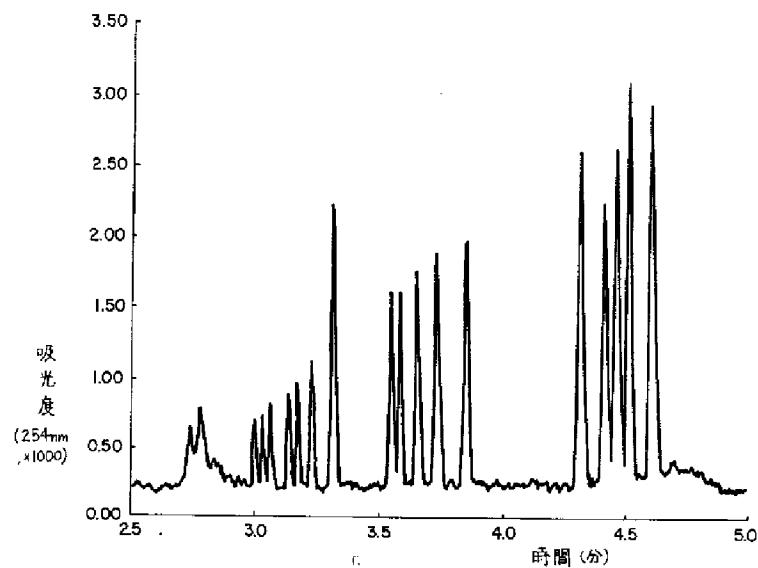
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 エバ・スゾコ
 アメリカ合衆国02148 マサチューセッツ
 州、マルデン、ヘーゼルウッド・ストリー
 ト 28